

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



BEST AVAILABLE COPY

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

10 2004 009 161.7

Anmeldetag:

25. Februar 2004

Anmelder/Inhaber:

HöFer Bioreact GmbH, 53115 Bonn/DE

Bezeichnung:

Optimierte Induktion und gerichtete selektive Festphasen-Kultivierung stabiler, mikrobieller Mischpopulationen zur kontinuierlichen Herstellung definierter Enzym- und Metabolitgemische und Verfahren und Vorrichtung dazu

IPC:

C 12 P 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Kahle



Optimierte Induktion und gerichtete selektive Festphasen-Kultivierung stabiler, mikrobieller Mischpopulationen zur kontinuierlichen Herstellung definierter Enzym- und Metabolitgemische und Verfahren und Vorrichtung dazu

5

Beschreibung der Erfindung

10 Es ist eine Vielzahl technologischer Prozesse bekannt, bei denen Enzyme bisher nur suboptimal oder gar nicht eingesetzt werden, obgleich dies von großem ökonomischen wie ökologischen Nutzen wäre. Dazu gehören zum Beispiel Verfahren, bei denen komplexe, biologische Festsubstrate verändert oder umgesetzt werden, deren Zusammensetzung sehr heterogen ist, die v. a. auch schwer abbaubare Substanzen wie Lignocellulose enthalten und/oder äußere Grenzschichten (z. B. verholzte Zellwände, Kuticula etc.) besitzen, welche Barrieren für Enzyme darstellen und so die Bioverfügbarkeit einschränken. Für eine effektive Behandlung dieser Substrate wären speziell auf diese Substrate hin optimierte Enzymmischungen notwendig. Dies ist bisher noch nicht als gezielte und gerichtete Herstellung durch entsprechende Fermentationen möglich.

15

20 Aus der eigenen Anmeldung DE 10328552.0 ist ein neues kontinuierliches Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem Festphasen-Bioreaktor, einem neuartigen, modularen Schneckenreaktor, bekannt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise zur Verfügung gestellt wird, dass diese in dem Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein, zusammengebracht wird, wobei unter Zielsubstrat(en) solche verstanden werden, die in einem nachfolgenden Prozess eingesetzt werden und unter Substraten solche verstanden werden, die hauptsächlich zur Optimierung der Zellmasse für eine optimale quantitative Enzymproduktion dienen.

25

30 Nachteile der vorliegenden Erfindung sind die oftmals langen Anwachszeiten der Mischkulturen auf den Zielsubstraten, Zielsubstrat-/Substratmischungen oder Substraten und die erst nach längeren Kultivierungszeiten erreichbaren optimalen Enzymausbeuten. Dieser Nachteil des Standes der Technik konnte überraschender Weise dadurch überwunden werden, dass in Erweiterung zu DE 1032852.0 eine auf festen oder flüssigen Nährböden adaptierte

Mischorganismen-Vorkultur als Impfanzucht zur Erzeugung einer stabilen, mikrobiellen Kultur, bevorzugt einer Mischkultur von Pilzen als eigentlicher Hauptkultur vorgeschaltet wird und diese in der Weise weiter fortgeführt wird, dass sie in einem Festphasen-Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen 5 allein zusammengebracht wird. Die Mischkulturen, die dabei unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein 10 Metabolitgemisch produzieren, werden in dem nachfolgenden Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate „step bei step“ oder kontinuierlich eingesetzt.

Diese erfindungsgemäße vorherige Adaptierung der v.a. Pilzgerneische auf speziellen induktiven Vorkulturmedien (fest/flüssig) hat überraschender Weise nicht nur eine erhebliche Steigerung der Enzymausbeute in der (den) Hauptkultur(en) zur Folge, sondern auch wesentlich verkürzte 15 Anwachszeiten auf den Hauptkulturmedien, was auch für die Nachfolgekulturen auf den Zielsubstraten wichtig ist.

Stand der Technik

In den letzten Jahrzehnten sind verstärkt Anstrengungen unternommen worden, Biomasse durch 20 enzymatischen Aufschluss zu behandeln (siehe zum Beispiel DE19845207A1). So existieren heute eine Reihe von Ansätzen, bei denen gereinigte Enzyme oder Enzymmischungen oder aber enzymproduzierende mikrobielle Rein- oder Mischkulturen zur Behandlung biologischer Substrate eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind die Behandlung von Holzhackschnitzeln im Zuge des Biopulping, die Behandlung von Einjahrespflanzen zur Verbesserung der Eigenschaften als 25 Futtermittel oder von Bagasse zur Herstellung von Bioalkohol. Jedoch verlaufen alle diese Prozesse nach wie vor suboptimal. Der Hauptgrund dafür ist, dass die verwendeten Enzymmischungen, Mikroorganismenkulturen oder Mikroorganismen-Mischkulturen nicht in optimaler Weise an die Zielsubstrate angepasst sind (z. B. sind die Organismen und Enzyme nicht optimal an kalte bis sehr kalte Standorte adaptiert und selektiert), was z. B. beim 30 Biopulping zu sehr langen Behandlungszeiten der Hackschnitzel führt mit entsprechend einhergehendem großen Platzbedarf für die Mietenflächen.

Viele biotechnologische Prozesse zur Behandlung von komplexen Substraten (meist Pflanzenmaterial aber auch z.B. Tierabfälle aus Tierschlachterien etc.) benötigen neben den 35 genannten Enzymgemischen (Hydrolasen, Oxidoreduktasen) zum möglichst weitgehenden Abbau oftmals zusätzlich (v. a. Oxidoreduktasen) bestimmte Cofaktoren oder Mediatoren, die teilweise noch unbekannt sind. Das heißt, dass einzelne Enzyme oder auch Zugaben von Gemischen zum

Prozess nur bedingt Erfolg zeigen, da nur ein Zusammenspiel von vorher auf die Zielsubstrate hin adaptierten und optimierten Enzymgemischen zusammen mit diesen zusätzlichen Faktoren eine optimale Performance zeigen können. Dies ist aber bisher ebenfalls nicht in optimaler Weise möglich.

5 Aus DE3539875A1 sind z. B. ein Verfahren und eine Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung einer Enzymmischung für die Behandlung von Biomasse in Biogasanlagen bekannt. Dabei wird jedoch mit einer reinen Kultur von *Aspergillus niger* und ohne Induktion dieser Kultur durch die für die spätere Methanisierung verwendeten pflanzlichen Substrate gearbeitet.

10 Deshalb ist nicht zu erwarten, dass die dort gebildete Enzymmischung optimal an den Biomasse verwertenden Prozess angepasst ist.

Optimal an ein komplexes, biologisches Substrat adaptierte und definierte Enzymgemische und/oder Metabolitgemische sind nur erzeugbar durch Selektionsdruck auf die produzierenden 15 Mikroorganismen-Populationen (Mischkulturen) und/oder durch deren Induktion durch die entsprechenden Zielsubstrate.

Nun ist allgemein bekannt, dass die Anwendung eines Selektionsdrucks auf Mischpopulationen von Mikroorganismen durch Einstellen definierter Umweltparameter im Zuge der Kultivierung dieser Organismen in der Regel zu bestimmten Populationsspektren führt. Diese Populationsspektren 20 sind jedoch ungerichtet und zufällig.

Ebenso ist bekannt, dass durch die Wahl der Kulturbedingungen bestimmte Arten von Mikroorganismen angereichert oder Kontaminanten unterdrückt werden können.

Bekannt ist auch, dass es während des Verlaufs solcher Kulturen in Abhängigkeit von den gewählten Selektionsbedingungen, aber auch in Abhängigkeit von der Substratbeschaffenheit und der Induktorverfügbarkeit (bei nicht konstitutiv gebildeten Proteinen und Metaboliten) zu zeitlich variierenden Metabolitspektren kommen kann. Jedoch gilt auch hier, dass diese Metabolitspektren ungerichtet und zufällig sind.

Verfahren der genannten Art werden z.B. auf definierten festen Nährböden (Agarplatten → Mutagenesebehandlungen, genetische Transformationen etc.) sowie im Bereich der 30 Submerskulturtechnik eingesetzt (in Form von Chemostaten oder Turbidostaten auch kontinuierlich). In letzterem Falle handelt es sich vor allem um Kultivierungen von Reinkulturen zur Erzielung von spezifischen Stoffwechselleistungen.

Bioreaktoren zur kontinuierlichen Umsetzung fester Substrate sind aus verschiedenen 35 Anwendungsbereichen (Lebensmitteltechnik, Kompostiertechnik usw.) bekannt. Beispielsweise wird das Fermentationsgut in Kompostieranlagen über Walzen befördert. Solche Verfahren

erlauben aber keine anspruchsvolle Regulation der Kultivierungsparameter. Die Verwendung von einer oder mehreren Förderschnecken in Festphasen-Bioreaktoren ist zum Beispiel aus DE10041977A1, DE4308920A1 und DE 4208920A1 bekannt. Diese Bioreaktoren sind jedoch nicht modular ausgelegt und sehen ebenfalls keine Möglichkeit der späteren Zugabe von Substraten und anderen Stoffen z.B. zur Induktion vor. Der in DE 100 29 668 A1 genannte Bioreaktor ist zwar ein Segmentschneckenförderer. Zum Unterschied zum erfindungsgemäßen Reaktor kann dieser nicht die zeitliche Abhängigkeit der quantitativen bzw. qualitativen Produktion der Enzymgemische als Regelgröße für die Regelung des laufenden Prozesses selbst aber auch der nachgeschalteten Zielprozesse nutzen, d.h. dieser besitzt nicht als bevorzugte erfindungsgemäße Eigenschaft Einstellmöglichkeiten und Regelung von pH und Feuchte, ist nicht optional sterilisierbar, besitzt insbesondere auch nicht die Möglichkeit der Zudosage von erfindungsgemäßen Substraten, Zielsubstraten, Induktoren, Hemmstoffen etc., bzw. besitzt nicht die Möglichkeiten der Beimpfung und der Entnahme von bewachsenem enzymhaltigen Substrat während des Anzuchtprozesses und des Enzyimbildungsprozesses.

15

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die oben beschriebenen Nachteile des Stands der Technik konnte zum Teil durch das in DE 10328552.0 beschriebene eigene angemeldete Verfahren sowie den entsprechenden Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung dieses Verfahrens behoben werden.

Die Hauptnachteile der in DE 10328552.0 beschriebenen Erfindung sind die bereits erwähnten oftmals langen Anwachszeiten der Mischkulturen auf den Zielsubstraten, Zielsubstrat-/Substratmischungen oder Substraten und die erst nach längeren Kultivierungszeiten erreichbaren optimalen Enzymausbenten.

25 Diese Nachteile des Standes der Technik können überraschender Weise dadurch überwunden werden, dass im Erweiterung zu DE 10328552.0 eine auf festen oder flüssigen Nährböden adaptierte Mischorganismen-Vorkultur als Impfanzucht zur Erzeugung einer stabilen, mikrobielle Kultur, bevorzugt einer Mischkultur von Pilzen als eigentlicher Hauptkultur vorgeschaltet wird und diese in der Weise weiter fortgeführt wird, dass sie in dem Festbett-Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein zusammengebracht wird, wobei unter Zielsubstrat(en) solche verstanden werden, die in einem nachfolgenden Prozess eingesetzt werden und unter Substraten solche verstanden werden, die hauptsächlich zur Optimierung der Zellmasse für eine optimale quantitative Enzymproduktion dienen. Die Mischkulturen, die dabei unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der 30 Kultivierungsparameter sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n)

Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produzieren, werden in dem nachfolgenden Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate „step bei step“ oder kontinuierlich eingesetzt.

5 Die festen oder flüssigen Nährböden zur Erzeugung von adaptierten Mischorganismen-Vorkulturen als Impfanzucht zur Erzeugung von stabilen, mikrobiellen Kulturen, bevorzugt Mischkulturen von Pilzen, können zum einen normale Agarböden sein, die mit Mischkulturen beimpft werden und die als entsprechende induktive Substrate sogenannte „natürliche Substrate“, gemahlene Zielsubstrate, Zielsubstrat-/Substratmischungen oder Substrate oder als sogenannte „synthetische Substrate“

10 Polysaccharide (z.B. Cellulosen, Hemicellulosen, Pektine), Proteine, Lipide etc., bzw. deren Gemische, bzw. auch Gemische zwischen „natürlichen Substraten“ und „synthetischen Substraten“ enthalten.

Zum anderen können diese auch beliebige Flüssiganzuchten wie z.B. Schüttelkolben oder Fermenteranzuchten, wobei bei Fermenteranzuchten zur Selektion von Hochleistungsstämmen auch Chemostat- oder Turbidostatkulturen eingesetzt werden können, oder „solid state“ (SSF) -Kulturen

15 sein, die mit Carrier als inertes Bewuchsmedium z.B. in Säulenreaktoren arbeiten und die mit dem entsprechendem Substrat oder Substratmischungen umspült werden.

Weiterhin können adaptierte Mischorganismen-Vorkulturen als Impfanzucht zur Erzeugung von stabilen, mikrobiellen Kulturen, bevorzugt Mischkulturen von Pilzen auch Kulturen sein, die eine induktive Vorkultur und eine bzw. mehrere unter Selektionsdruck geführte Hauptkulturen durchlaufen

20 haben. Diese so gewonnenen hochselektiven Impfkulturen können direkt eingesetzt werden oder durch Verfahren wie Einfrieren, Lyophilisation und ähnliche Techniken (nach Stand der Technik) haltbargemacht werden und dann bei Gebrauch eingesetzt werden.

Der entsprechende Selektionsdruck mittels Variation der Kultivierungsparameter wird dabei durch geeignete Wahl des Feuchtegehalts (Wasseraktivität), des pH-Wertes, der Temperatur, der Sauerstoffverfügbarkeit, des Redoxpotentials und der Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen eingestellt und aufrecht erhalten.

Dabei sind spezielle Hemmstoffe solche, wie sie z.B. in: R. Vogel; Natürliche Enzyminhibitoren, Georg Thieme Verlag, 1984 und in: H. Zollner; Handbook of Enzyme Inhibitors, VCH, 1989 beschrieben sind.

Ein wichtiger Bestandteil der erfundungsgemäßen Anwendung ist weiterhin, dass als Pilzkulturen zur Erzeugung von adaptierten Mischorganismen-Vorkulturen als Impfanzucht zur Erzeugung von stabilen, mikrobiellen Hauptkulturen Weißfäulepilze eingesetzt werden, die v.a. für nachgeschaltete mikrobiologische Prozesse wie Abbaureaktionen bzw. Hydrolysereaktionen, bzw. an diese gekoppelte mikrobielle Umwandlungen wie z.B. Methangärungen, alkoholische Gärungen etc. Mangan-

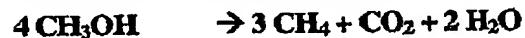
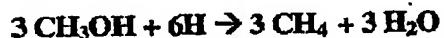
Peroxidase (MnP) und Laccase zur Verfügung stellen. Dabei wird das zur Wirkung von MnP nötige H_2O_2 entweder kontinuierlich in kleinen Dosagen zugegeben oder in situ mittels Enzymen wie Glukose Oxidase I und II (GOD I und II), Glyoxal Oxidase, Methanol Oxidase, Galaktose Oxidase, Cellubiose Chinon Oxidoreduktase (CBQ) oder Cellubiose Dehydrogenase (CDH) etc.

5 generiert.

Es ist bekannt, dass diese Enzyme in der Lage sind, mit und ohne gleichzeitigem Ligninabbau Lignin in erheblichem Umfang zu demethylieren.

Der entstehende Methylalkohol CH_3OH wird dabei teilweise zu CO_2 oxidiert und mit dem gebildeten Wasserstoff gleichzeitig zu Methan (CH_4) nach folgender Summengleichung reduziert:

10



15 Da in vielen v.a. landwirtschaftlichen Rohstoffen und Abfallstoffen der Ligningehalt relativ hoch ist und bis zu 20% Trockengewicht betragen kann, können erhebliche Methanresourcen erschlossen werden. Als Zusatzeffekt könnte durch die Wirkung der Laccasen und auch der H_2O_2 -produzierenden Enzymsysteme der vorhandene Restsauerstoffgehalt weiter minimiert werden, was die Gärührung günstig beeinflussen sollte.

20 Bei der Hydrolyse oder dem Abbau von Roh- bzw. Abfallstoffen nachgeschalteten Gärungen wie z.B. Methangärungen, alkoholische Gärungen etc. oder generell könnte ebenfalls durch den Abbau von Ligninstoffen über Laccase oder $MnP/Mn^{3+}/H_2O_2$ -systeme die Reduzierung von schwer verwertbaren Abfallstoffen von erheblichem Nutzen sein.

25 Ein wichtiger Bestandteil der erfindungsgemäßen Anwendung ist weiterhin, dass nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung der Hauptkulturen die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische entweder als solche in nachfolgenden Verfahren eingesetzt werden oder eine Abtrennung des Substrat-Pilz-Gemisches zur Gewinnung eines flüssigen Enzymcocktails erfolgt. Des weiteren ist es möglich, die in solcher Weise gewonnenen flüssigen Enzymmischungen einem weiteren

30 Downstream-Prozessing zu unterziehen (Aufreinigung durch Ultrafiltrationen, Chromatographieverfahren etc.).

Ein wichtiger Bestandteil der erfindungsgemäßen Anwendung ist weiterhin, dass nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung der Hauptkulturen die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische durch mittels anderer Verfahren hergestellte Enzyme (auch käufliche) in der 35 Weise substituiert werden, dass diese fehlende wichtige Aktivitäten zum Abbau oder zur Modifizierung der Zielsubstrate dem erfindungsgemäßen Enzymspektrum hinzufügen.

Ebenfalls ist ein wichtiger Bestandteil der Erfindung mit erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung, dass die natürliche Kontaminations-Population von bestimmten Zielsubstraten/Substraten ausgenutzt wird, um daraus gewünschte Keime mit gewünschten Eigenschaften zu selektieren. Die Zugabe solcher Keime erfolgt zu Beginn der Kultivierung, d.h. auch bereits bei den Impfanzuchten oder zusätzlich während der Anzucht. Es können auch direkt zu den Impfanzuchten oder zusätzlich während der Hauptanzucht Reinkulturen der Organismen, die auf diesen Zielsubstraten/Substraten natürlicherweise vorkommen und/oder daraus nach Vereinzelung und Bestimmung gezüchtet wurden oder solche, die aus Sammlungen stammen oder andere Organismenstämme (z.B. Hochleistungsstämme), die in ihrem Enzymspektrum passend sind, zugegeben werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist ferner, dass nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung das erfindungsgemäße Verfahren der Hauptkultur aus einer bis mehreren Verfahrensstufen bestehen kann. Diese Verfahrensstufen können generell gleichzeitig ablaufen, d. h. es wird mit gleichzeitig eingesetzten Zielsubstraten und/oder Substraten (in Ein- oder Mehrzahl) gearbeitet, zusätzliche Induktoren und/oder Hemmstoffe können gleichzeitig oder sequenziell während der Kulturdauer zugegeben werden. Die Verfahrensstufen können aber auch zeitlich hintereinander durch den sequenziellen Einsatz von Zielsubstraten und/oder Substraten in Einzahl oder Mehrzahl durchgeführt werden.

Dies wird u.a. durch die kontinuierliche Verfahrensführung und modulare Bauweise des in DE 10328552.0 beschriebenen Bioreaktors, ermöglicht, der für das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt ist, und der durch seine Bauweise eine zusätzliche Substratzugabe, Zugabe von anderen Induktoren, Hemmstoffen, Zugabe von Mikroorganismenkulturen, Änderung des Selektionsdrucks etc. während der Kulturdauer erlaubt.

Das beschriebene erfindungsgemäße Verfahren mit erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung kann generell mit allen ähnlichen „solid state“ Reaktoren durchgeführt werden, die die zeitliche Abhängigkeit der quantitativen bzw. qualitativen Produktion der Enzymgerneische als Regelgröße für die Regelung des laufenden Prozesses selbst aber auch der nachgeschalteten Zielprozesse nutzen können.

Bei Anzuchten mit mehreren Verfahrensstufen (z. B. 2-stufig) wird nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung mit vorinduzierten Vorkulturen (abhängig vom Zielprozess), wobei diese Vorkulturen entweder aus a) Organismen des natürlichen Bewuchses der zu beimpfenden Substrate bestehen

können und/oder b) aus Organismen, die aus Reinkulturen (auch Hochleistungsstämme bzw. auch Stämme aus Sammlungen) oder aus Gemischen von a) und b) bestehen können, in der ersten Verfahrensphase eine Misch-Hauptkultur durch Wahl geeigneter Substrate und/oder Zielsubstrate, durch Einstellen weiterer selektiver Bedingungen mittels geeigneter selektiver Einstellung der 5 Wasseraktivität, des pH-Werts, des Redoxpotentials, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der Verfügbarkeit von Induktoren usw. erzeugt. Ziel dieser ersten Phase des Verfahrens ist es, einen für die zweite Verfahrensphase geeigneten Pool (qualitativ und quantitativ) an mikrobiellen Populationen und Enzymspektren zur Verfügung zu stellen. Die Mischkultur wird in der zweiten Stufe des Verfahrens durch Zugabe eines weiteren Substrates und/oder Zielsubstrates oder mehreren gleichzeitig 10 und durch Einstellen gegebenenfalls anderer (als in der ersten Stufe) selektiver Bedingungen, d.h. durch eine geeignete Wahl der Wasseraktivität, des pH-Werts, des Redoxpotentials, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der Verfügbarkeit von Induktoren usw. gerichtet in eine stabile und optimale adaptierte Mischkultur überführt (fine-tuning), die nach einer gegebenen Kulturdauer ein ebenfalls definiertes Spektrum an Enzymen und/oder Metaboliten erzeugt, das an die zur Induktion 15 verwendeten Zielsubstrate optimal adaptiert ist.

Durch die erfindungsgemäße durch Selektionsdruck und Induktion optimierte Impfkulturführung können eine erheblich (qualitativ und quantitativ) verbesserte Enzymausbeute und verbessertes Enzymspektrum bei erheblich verringertem Zeitbedarf der Kultureinstellung und der Gesamtkulturdauer erzielt werden.

20 Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist ferner, dass nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung vor nachgeschalteten Prozessen wie speziellen Gärungen z.B. Methangärung etc. die erfindungsgemäß vorinduzierte Mikroorganismenmischungen nicht nur direkt (z.B. per Schneckenreaktor) den zu hydrolysierenden und gleichzeitig zu vergärenden Substraten (z.B. Methangärungen) zugeführt werden, sondern zunächst in einen Vorhydrolysebehälter geleitet werden, um eine Vorverzuckerung oder im optimalen Fall eine vollständige Hydrolyse der Polysaccharide und anderer Polymere wie z.B. Proteine und Fette einzuleiten. Die entsprechenden Hydrolysate werden dann der eigentlichen Gärung zugeleitet. Dies hat den Vorteil einer besseren 25 Dosierbarkeit der benötigten vergärbaren Zucker mit einer entsprechend höheren Prozesssicherheit.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Erfindung ist ferner, dass nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiven Verfahrensführung vor nachgeschalteten Prozessen das vorinduzierte Mikroorganismengemisch in eine weitere solid state Verfahrensführung überführt wird, in der das gesamte (z.B. später zu vergärende) Substrat 30 selektiv zur Erzeugung von Enzymen genutzt wird und zumindest partiell hydrolysiert wird. Hier

soll vorzugsweise mit Organismenmischungen, z.B. Weißfäulepilzgemischen, gearbeitet werden, die nur geringe Zuckermengen bei hohen Enzymsbildungsraten verstoffwechseln.

Es ist weiterhin bevorzugt, die Mischpopulationen, die erfindungsgemäß in einem Nebenstrom

(z.B. Schneckenreaktor) (entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren mit

5 erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiven Verfahrensführung) erzeugt wurden, zusätzlich in die nachfolgenden Gärungen (z.B. Methangärung) mittels Mischpopulationen anderer Mikroorganismen einzubringen.

Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist ferner, dass nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung das vorinduzierte

10 Mikroorganismengemisch (Bakterien und Pilze) in eine weitere solid state Verfahrensführung überführt wird, in der das gesamte Substrat selektiv zur Erzeugung von Enzymen genutzt wird und zumindest partiell z.B. zu Kompostierungszwecken hydrolysiert bzw. umgewandelt wird.

Eine weitere bevorzugte Applikation ist dabei insbesondere der Abbau von Xenobiotika.

15 Wie in der eigenen Anmeldung **DE 10328552.0** beansprucht, soll auch das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren auf alle technologischen Prozesse angewendet werden, bei denen biologische Substrate verändert oder umgesetzt werden und eine Behandlung dieser Substrate durch Enzyme entweder Gegenstand der Prozesse selbst ist oder aber als Vor- oder Zusatzbehandlung genutzt werden kann.

20 Dies gilt insbesondere für Prozesse aus:

- 1) der holzverarbeitenden Industrie wie der Papier- und Zellstoffindustrie,
- 2) der Textilindustrie,
- 3) der Lederindustrie,
- 4) der tierverarbeitenden Industrie,
- 5) der Waschmittelindustrie,
- 6) der Futterindustrie,
- 7) der Lebensmittelindustrie,
- 8) für Prozesse in der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung,
- 9) in der Reststoffverarbeitung und

30 10) für Prozesse, die zur Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

Über die oben genannten Anwendungsmöglichkeiten hinausgehend konnte überraschenderweise gefunden werden, dass das erfindungsgemäße Verfahren zur weiteren erheblichen Steigerung der Verfügbarkeit bzw. zum Aufschluss von durch normale chemische Verfahren nicht weiter Ausbeute-optimierbaren (quantitativ bzw. qualitativ) Stoffen dienen kann. Bevorzugt handelt es sich um schwer zugängliche Reststoffe wie Restzucker (Polymere, Oligomere etc.), Proteine, Fette und andere Polymere oder generell biologisch extrahierbare, abbaubare bzw. modifizierbare Stoffe, was eine

erhebliche Wertschöpfungssteigerung des gesamten meist vorgeschalteten in der Regel chemischen Prozesses beinhaltet.

Solche erfindungsgemäß optimierten Prozesse sind z.B. die mittels des erfindungsgemäßen Systems durchgeführten Nachextraktionen von chemisch vorextrahierten Stoffen wie Zuckerrübenschitzel,

5 Zuckerrohr, Getreide und anderen pflanzlichen und tierischen Rohstoffen oder Abfallstoffen.

Hauptsächliches Ziel des Einsatzes des erfindungsgemäßen Verfahrens z.B. bei der Behandlung von Zuckerrüben ist die Ausbeutesteigerung von gewinnbaren Zuckern durch weitere enzymatische Extraktion und/oder enzymatische Hydrolyse aus den Reststoffen der chemischen Extraktion wie bereits ausgelaugten Schnitzeln, d.h. insbesondere die Freisetzung und eventuelle Hydrolyse von in den

10 Gewebeteilen der Schnitzel (chemisch schwierig gewinnbar) verbliebenen Zuckeranteilen. Diese -in diesem Fall- Zucker können dann in weiteren Prozessen gereinigt, aufgetrennt, veredelt in andere Stoffe umgewandelt oder in andere Energieträger umgesetzt werden.

Des weiteren kann das erfindungsgemäße Verfahren (generell oder für diesen speziellen Anwendungsfall) auch Teil einer bestimmten Behandlungslinie sein; d.h. es kann z.B. eine chemische 15 und/oder enzymatische und/oder mikrobielle Behandlung vorgeschaltet und ein weiterer chemischer und/oder enzymatischer und/oder mikrobieller Prozess nachgeschaltet sein, wobei unter mikrobiellen Prozessen solche verstanden werden, die mit wachsenden Mikroorganismen (v.a. Bakterien und/oder Pilzen) arbeiten wie Gärungen (alkoholische Gärungen, Methangärungen) oder generell Stoffumwandlungsprozesse.

20

Anwendungen:

Textilindustrie, holzverarbeitenden Industrie (Papier-, Zellstoff- und Holzboard- Industrie, Biopulping), Waschmittelindustrie, Lederindustrie, tierverarbeitenden Industrie, Futterindustrie, Lebensmittelindustrie:

25

Bei diesen Anwendungen sollen die erfindungsgemäßen Enzymmischungen, hergestellt nach erfindungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung, vorzugsweise zum Abbau, der Umwandlung oder der Modifizierung der entsprechenden Substrate eingesetzt werden, d.h. Enzymcocktails zur Verfügung gestellt werden, die z.B. im Gegensatz zu käuflichen Enzymen möglichst alle zum Abbau, der Umwandlung oder Modifizierung der jeweiligen 30 Substrate nötigen Enzyme und eventuell Cofaktoren besitzen, um diese genannten Substratänderungen in optimaler Weise durchführen zu können.

Anwendungen:

35 Prozesse in der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung, der Reststoffverarbeitung und Prozesse, die zur Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

Hier sollen bevorzugt die hergestellten erfundungsgemäßen Enzymmischungen, erzeugt nach erfundungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfundungsgemäßer selektiver Verfahrensführung, ebenfalls zum Abbau, der Umwandlung oder der Modifizierung der entsprechenden Substrate eingesetzt werden. Zusätzlich sollen bei der Abwasserreinigung die zu reinigenden Abwässer als

5 Induktorsubstrate eingesetzt werden, was an jeder Stelle der Induktionskaskade geschehen kann, um die optimal adaptierten Organismen- und Enzymmixe zu erhalten. Bei der Abluftreinigung sollen die relevanten belastenden Gase der Sauerstoff-Belüftung als induktiver Teilstrom zugeführt werden und bei der Bodenreinigung die belasteten Böden ebenfalls als Induktionssubstrat dienen.

Bei der Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe sollen - wie oben erwähnt- die hergestellten erfundungsgemäßen Enzymmischungen, erzeugt nach erfundungsgemäßer optimaler Beimpfung und erfundungsgemäßer selektiver Verfahrensführung, z.B. als Hydrolysekatalysator bevorzugt vor

10 Prozessen wie Biogaserzeugung, Bioäthanolerzeugung, Kompostierung hergestellt werden (Produktionsstufe) und entweder vor (Hydrolysestufe/ z.B. Bioäthanolerzeugung, Biogaserzeugung, Kompostierung) und/oder während dieser Verfahrensstufen zur Wirkung gebracht werden.

15 Neben dem bevorzugten in DE 10328552.0 beschriebenen Bioreaktor, der zur kontinuierlichen Durchführung des dargestellten erfundungsgemäßen Verfahrens besonders geeignet ist, sollen prinzipiell andere Feststoffbioreaktoren zur Festphasen-Kultivierung von Mikroorganismen zum Einsatz kommen wie die, die in den eigenen Anmeldungen PCT WO 01/19954, WO 02/100999 A2,

20 PCT/EP03/01663 genannt sind oder generell Schneckenreaktoren, Trommelreaktoren, Tumreaktoren, Rieselfilmreaktoren etc. gegebenenfalls modifiziert oder in Form einer Kaskade. Besonders bevorzugt sind Reaktoren nach dem Prinzip der Stetigförderer, flexiblen Schnecken, Endlosschnecken, die nach dem Prinzip der Scheckenförderung, Druckschneckenförderung Schneckenförderung nach dem Prinzip eines Feststoff-Airliftreaktors etc. oder Förderbandförderung funktionieren, einzeln oder bevorzugt in Kaskadenform. Dabei kann das beschriebene erfundungsgemäße Verfahren mit erfundungsgemäßer optimaler Beimpfung generell mit allen solid state Reaktoren durchgeführt werden, die die zeitliche Abhängigkeit der quantitativen bzw. qualitativen Produktion der Enzymgemische als Regelgröße für die Regelung des laufenden Prozesses selbst aber auch der nachgeschalteten Zielprozesse nutzen können, d.h. die als bevorzugte

25 erfundungsgemäße Eigenschaften generell sterilisierbar sein können, belüftbar sein sollten, über Einstellmöglichkeiten (Einstellung, Regelung) von pH, Feuchte und Temperatur verfügen sollten und insbesondere die Möglichkeit der Zudosage von erfundungsgemäßen Substraten, Zielsubstraten, Induktoren, Hemmstoffen etc. und Möglichkeiten der Beimpfung und der Entnahme von bewachsenem enzymhaltigen Substrat besitzen sollten.

30 Dabei ist die Kaskadenform deswegen besonders bevorzugt, um die zeitliche Abhängigkeit der Produktion der Enzymgemische zu deren Optimierung im Hinblick auf den Abbau des Zielsubstrats

35

bzw. der Zielsubstrate simultan und sequenziell hin zu nutzen, d. h. es wird möglich, einen oder mehrere dem Enzyimbildungsprozess nachgeschaltete Prozesse mit entsprechend optimierten Enzymcocktails simultan oder sequenziell zu versorgen. Ebenso wird es möglich Zeitunterschiede während der Produktion auszugleichen, indem man die Kaskade als „Endlosschleife“ nutzt und mehrere Kaskaden parallel schaltet.

Neben allen möglichen kontinuierlichen und fed-batch Prozessen sind Batchprozesse in den genannten Reaktoren oder Verfahren entweder per se oder bei Prozessen, bei denen Batchprozesse alternierend zu kontinuierlichen Prozessen und/ oder fed – batch Prozessen eingesetzt werden, ebenso bevorzugt.

Der Bau und die Funktion und der entsprechende Betrieb des bevorzugten Schneckenreaktors bzw. der Schneckenreaktor-Kaskade ist in DE 10328552.0 detailliert beschrieben, eine Reaktorbeschreibung liefert Abb.1.

Beispiel I:

Kontinuierliche Produktion spezifischer Hydrolasegemische mit induktiv optimierter Vorkultur zur Verzuckerung von ausgelaugten Zuckerrübenschnitzeln

Die vorliegende Erfindung wird durch folgendes Anwendungsbeispiel näher beschrieben; die Erfindung ist aber nicht auf dieses Beispiel beschränkt.

Nachwachsende Rohstoffe enthalten in der Regel signifikante Mengen schwer abbaubarer Biopolymere wie Lignocellulose, Cellulose, Hemicellulosen (Xylan), Pektin, Cutin etc.. Diese mengenmäßig bedeutsamen Biopolymere, die den Hauptbestandteil oder z.B. für Zuckerrüben- bzw. Zuckerrohrabfälle einen wichtigen Anteil bilden und in der Landwirtschaft in großen Mengen anfallen, können bislang nicht oder nur suboptimal genutzt werden. Zudem ist ihr Einsatz als Futtermittel zum Teil durch gesetzliche Verordnungen begrenzt.

Beispiel 1: Zweiphasenkultur zur Erzeugung von Hydrolasegemischen für einen nachfolgenden enzymatischen Extraktionsprozess für ausgelaugte Zuckerrübenschnitzel

Verfahrensgemäß werden in einer 2-Phasenanzucht mit vorgeschalteter induktiver Vorkultur zur Herstellung der Vorkulturen gemahlene (Retsch Zentrifugalmtühle: ca. 250 μ Siebmaschenweite) Pressrübenschnitzeln/Rapsschrot zu je 2% in 2%ige Agarsuspension + 0.5% Yeast Extract (w/v) gegeben und nach Autoklavieren in Petrischalen gegossen (ca. 30 ml pro Petrischale/ 9cm

Durchmesser). Nach Erkalten und ca. 3tägigem Trocknen bei Raumtemperatur werden die Vorkultunährböden mit *Penicillium chrysogenum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis* und *Neurospora spec.* beimpft. Dazu wird aus je einer bewachsenen Agarkultur des jeweiligen Pilzes mittels Korkbohrer ein rundes Inokulumstück ausgestochen und in ein vorher ausgestanztes Loch der Impfplatte gegeben. Die induktive Vorkulturphase bei ca. pH 5-6 und einer Temperatur von ca. 30 °C dauert ca. 4-6 Tage. Abhängig von der Menge der zu beimpfenden Phase-1-Kultur wird der Inhalt von Vorkulturplatten in einem Schlagwerk (z.B. Waring Blender) zerkleinert und in das Zielsubstrat 1 (Pressrübenschitzel) gemischt und unter geeigneten Kulturparametern in dem genannten bevorzugten Schneckenreaktor selektiv eine Mischkultur zur Produktion der gewünschten hydrolytischen Enzyme erzeugt (Gesamtfeuchtegehalt: 50%, pH 5-6, ca. 30 °C). In der zweiten Verfahrensstufe wird durch Zugabe des Zielsubstrats 2 (ausgelaugte und zerkleinerte Zuckerrübenschitzel) selektiv und gezielt eine weiter konditionierte und optimierte Mischkultur erzeugt mit einem dem Zielsubstrat Zuckerrübenschitzel angepassten Spektrum hydrolytischer Enzyme (Gesamtfeuchtegehalt: 40%, pH 5-6, ca. 30 °C).

15 Das gesamte, enzymhaltige Fermentationsgut wird dem zu verzuckernden Substrat: ausgelaugte Zuckerrübenschitzel kontinuierlich zugegeben → Verzuckerungsstufe (pH 5-6, ca. 30 °C). Die aktiven Enzyme schließen während der Verzuckerungsstufe, die unter Luftabschluss stattfindet, um ein Weiterwachsen der Pilze mit ungewünschter Verstoffwechslung der Zucker zu verhindern, die pflanzlichen Rest-Polymeren auf.

20 Mit dem erfundungsgemäß erzeugten Enzymcocktail mit induktiv optimierter Vorkultur konnte im Laborversuch die Gesamt-Zuckerausbeute um 10% im Vergleich zum Enzymgemisch, erzeugt ohne induktiv optimierte Vorkultur, gesteigert werden.

Patentansprüche

1) Neuartige Anzucht, dadurch gekennzeichnet,

dass eine auf feste oder flüssige optimal induktive Nährböden adaptierte Mischorganismen-Vorkultur

5 als Impfanzucht zur Erzeugung einer stabilen Mischkultur von Pilzen, der eigentlichen Hauptkultur, vorgeschaltet wird und dass die Hauptkultur in der Weise weiter fortgeführt wird, dass diese in einem Festphasen-Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen Substraten allein zusammengebracht wird und dass die Mischkultur dabei unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der 10 Kultivierungsparameter sowie durch spezifische Induktion durch das oder die Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen gehalten wird und nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein 15 Metabolitengemisch produziert, welches zur Verzuckerung von allen möglichen natürlichen Polysaccharid-Substraten bzw. zum Abbau von pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen Polymeren eingesetzt wird.

2) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die auf feste oder flüssige optimal induktive Nährböden adaptierte Mischorganismen-Vorkulturen als Impfanzucht zur Erzeugung

20 einer stabilen Mischkultur von Pilzen auf normalen Agarböden oder „solid state“ (SSF) -Kulturen wie Säulenreaktoren mit inerten Carriern als Bewuchsmedium oder in beliebigen Flüssiganzuchten wie 25 Schüttelkolben oder Fermenteranzuchten durchgeführt werden.

3) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die adaptierten

Mischorganismen-Vorkulturen als Impfanzucht zur Erzeugung einer stabilen Mischkultur von Pilzen auch Kulturen sind, die eine induktive Vorkultur und eine bzw. mehrere unter Selektionsdruck geführte 30 Hauptkulturen durchlaufen haben.

4) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die adaptierten

Mischorganismen-Vorkulturen als Impfanzucht zur Erzeugung einer stabilen Mischkultur von Pilzen

35 auch Kulturen sind, die eine induktive Vorkultur und eine bzw. mehrere unter Selektionsdruck geführte Hauptkulturen durchlaufen haben und entweder direkt eingesetzt werden oder nach Haltbarmachung durch Einfrieren und/oder Lyophilisation.

5) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der entsprechende

35 Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt

(Wasseraktivität), pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. aufgebaut und aufrecht erhalten wird.

6) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Substrate und/ oder Zielsubstrate alle möglichen Rohstoffe oder Abfälle natürlichen (mikrobiellen, pflanzlichen, tierischen oder menschlichen) und nicht natürlichen industriellen Ursprungs und deren Gemische eingesetzt werden.

7) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung von Mischkulturen mindestens zwei Mikroorganismen eingesetzt werden.

8) Neuartige Anzucht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Ascomyceten, Deuteromyceten) der Gattungen *Penicillium spec.*, *Aspergillus spec.*, *Trichoderma spec.*, *Fusarium spec.*, *Eurotium spec.*, *Absidia spec.*, *Neurospora spec.*, *Mucor sp.*, *Chaetomium sp.*, *Rhizopus sp.*, etc. eingesetzt werden.

9) Neuartige Anzucht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Ascomyceten, Deuteromyceten) der Arten *Penicillium chrysogenum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum* und *Neurospora intermedia* eingesetzt werden.

10) Neuartige Anzucht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Weißfäulepilze, Braunfäulepilze) der Gattungen *Trametes spec.*, *Pleurotus spec.*, *Phanerochaete spec.*, *Nematoloma spec.* und *Agaricus spec.* etc. eingesetzt werden.

11) Neuartige Anzucht nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Weißfäulepilze) eingesetzt werden, die Laccase bzw. Mangan Peroxidase produzieren wie Organismen der Gattungen *Trametes spec.*, *Pleurotus spec.*, *Phanerochaete spec.* und *Agaricus spec.* etc..

12) Neuartige Anzucht nach den Ansprüchen 7 und 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Weißfäulepilze) eingesetzt werden wie Organismen der Gattungen *Trametes spec.*, *Pleurotus spec.*, *Phanerochaete spec.* und *Agaricus spec.* etc., die neben lignolytischen Enzymen wie Laccase bzw. Mangan Peroxidase auch weitere Oxidäsen sekretieren, welche H_2O_2 produzieren, wie Glukose Oxidase I und II (GOD), Glyoxal Oxidase,

Methanol Oxidase, Galaktose Oxidase, Cellubiose Chinon Oxidoreduktase (CBQ) oder Cellubiose Dehydrogenase (CDH) etc..

13) Neuartige Anzucht nach den Ansprüchen 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, dass das für die 5 Peroxidase-Wirkung benötigte H₂O₂ durch Zudosage zugegeben wird.

14) Neuartige Anzucht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Bakterien (Actinomyceten) der Gattungen *Streptomyces spec.* etc. eingesetzt werden.

10 15) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische entweder als solche eingesetzt werden, oder eine Abtrennung des Substrat-Pilz-Gemisches zur Gewinnung von flüssigen Enzymcocktails erfolgt.

15 16) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische durch mit Hilfe anderer Verfahren hergestellte bzw. käufliche Enzyme substituiert werden.

17) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren aus einer bis mehreren Verfahrensstufen bestehen kann.

20 18) Neuartiges Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Produktion der Enzymgemische (hydrolytische Enzymcocktails/oxidative Enzymcocktails) zur enzymatischen Extraktion (hydrolytischen Verzuckerung) von Zuckerrübenschnitzeln durchgeführt wird.

25 19) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Produktion der Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) zur enzymatischen Extraktion (hydrolytischen Verzuckerung) von Zuckerrübenschnitzeln mindestens mittels einer 2-Phasen-Anzucht durchgeführt wird.

30 20) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Produktion der Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) auch zur enzymatischen Extraktion (hydrolytische Verzuckerung, Polymerabbau) von z.B. chemisch vorextrahierten Stoffen wie Zuckerrohr, Getreide und anderen pflanzlichen und tierischen Rohstoffen oder Abfallstoffen benutzt wird.

21) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Produktion der Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) zur enzymatischen Extraktion (hydrolytische Verzuckerung, Polymerabbau) von pflanzlichen und tierischen Rohstoffen oder 5 Abfallstoffen vor einer chemischen und/oder enzymatischen und/oder mikrobiellen Behandlung wie spezielle Gärungen oder nach diesen vorgenommen wird.

10 22) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen und Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) nach optimaler Beimpfung und selektiver Verfahrensführung den nachgeschalteten Prozessen wie speziellen Gärungen (Methangärungen) entweder direkt zugeführt werden oder zunächst in einen Vorhydrolysebehälter geleitet werden, um eine Vorverzuckerung oder im optimalen Fall eine vollständige Hydrolyse der Polysaccharide, anderer Polymere wie z.B. Proteine und Fette zu bewirken.

15 23) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen und Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) nach optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung in eine weitere solid state Verfahrensführung überführt werden, in der das gesamte später zu vergärende Substrat 20 selektiv zur Erzeugung von Enzymen genutzt wird und zumindest partiell hydrolysiert wird.

25 24) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 23, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen Weißfäulepilzgemische sind oder solche Organismenmischungen, die nur geringe Zuckermengen bei hohen Enzymsbildungsraten verstoffwechseln.

29 25) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 23, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen und Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) nach optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung, die in einem Nebenstrom zusätzlich zu der Haupt-solid state Verfahrensführung erzeugt wurden, mit dieser 30 zusammen in die nachfolgenden Gärungen mittels Mischpopulationen anderer Mikroorganismen eingebracht werden.

35 26) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 23, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen und Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) nach optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung in eine weitere

solid state Verfahrensführung überführt werden, in der das gesamte Substrat selektiv zur Erzeugung von Enzymen für Kompostierungszwecken genutzt wird.

27) Neuartige Anzucht nach den Ansprüchen 1 und 23, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen und Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) nach optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung in eine weitere solid state Verfahrensführung überführt werden, in der das gesamte Substrat selektiv zur Erzeugung von Enzymen zum Abbau von Xenobiotika benutzt wird.

10 28) Neuartige Anzucht nach den Ansprüchen 1 und 23, dadurch gekennzeichnet, dass die vorinduzierten Mikroorganismenmischungen und Enzymgemische (hydrolytische, oxidative Enzymcocktails) nach optimaler Beimpfung und erfindungsgemäßer selektiver Verfahrensführung von flüssigen oder gasförmigen Induktionssubstraten durchströmt werden wobei diese durch die gebildeten Enzyme abgebaut oder umgewandelt werden.

15 29) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem Schneckenreaktor nach Abb. 1. entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, erfolgen.

30) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten generell in Schneckenreaktoren, Trommelreaktoren, Turmreaktoren, Rieselfilmreaktoren, der Festphasen-airliftreaktoren etc. nach dem Prinzip der Scheckenförderung, Druckschneckenförderung Förderbandförderung, etc. gegebenenfalls modifiziert oder in Form einer Kaskade durchgeführt werden.

25 31) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in speziellen Festphasen-airliftreaktoren durchgeführt werden.

30 32) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1 und 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten als Batchkulturen, als Fed-batchkulturen oder kontinuierlich durchgeführt werden.

35 33) Neuartige Anzucht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten mit optimiert induktiven Vorkulturanzuchten zur kontinuierliche Produktion spezifischer Hydrolase-Cocktails und/oder Oxidoreduktase-Cocktails für Prozesse aus der holzverarbeitenden Industrie, der Papier- und Zellstoffindustrie, der Textilindustrie, der Lederindustrie, der tierverarbeitenden Industrie, der Waschmittelindustrie, der Futterindustrie, der Lebensmittelindustrie, in

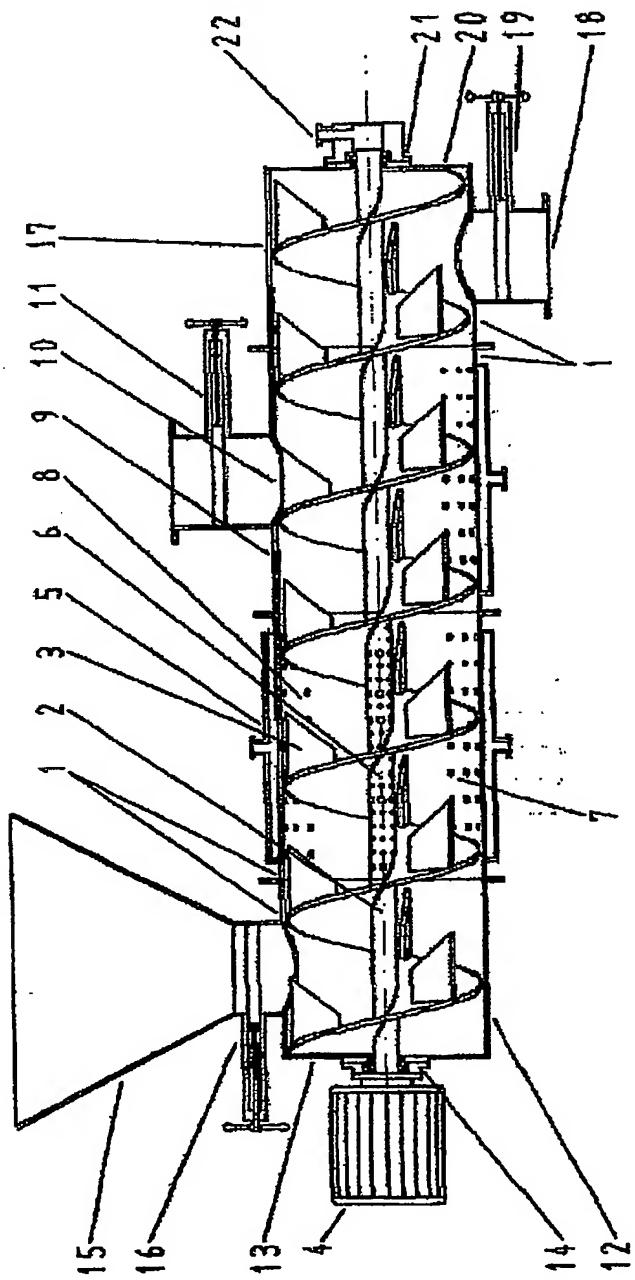
der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung, in der Reststoffverarbeitung und bei der Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

Zusammenfassung

Es wird ein neuartiges Anzuchtverfahren vorgestellt, dadurch gekennzeichnet,
dass eine auf festen oder flüssigen optimal induktiven Nährböden adaptierte Mischorganismen-
5 Vorkultur als Impfanzucht zur Erzeugung einer stabilen Mischkultur von Pilzen, der eigentlichen
Hauptkultur, vorgeschaltet wird und dass die Hauptkultur in der Weise weiter fortgeführt wird, dass
diese in einem Festphasen-Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen
möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen Substraten allein
10 zusammengebracht wird und dass die Mischkultur dabei unter entsprechendem Selektionsdruck durch
geeignete Wahl der Kultivierungsparameter sowie durch spezifische Induktion durch das oder die
Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen gehalten wird und nach einer gegebenen
Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein
Metabolitengemisch produziert, welches zur Verzuckerung von allen möglichen natürlichen
15 Polysaccharid- Substraten bzw. zum Abbau von pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen Polymeren
eingesetzt wird.

Abb. 1

21



Der erfindungsgemäße Bioreaktor (nach Abb. 1) besteht aus einer beliebigen Anzahl von Modulen, wobei insgesamt 4 Typen von Modulen vorgesehen sind. Alle Module bestehen aus einer Edelstahlröhre (1), in der eine Schnecke mit Hohlwelle (2) drehbar gelagert ist. Die Schnecke ist mit Schikanen (3) zur vertikalen Vermischung des Fermentationsguts ausgestattet. Die einzelnen Module 5 und auch die Förderschnecke können über ein geeignetes Verbindungssystem aneinander befestigt werden. Im zusammengesetzten Zustand werden die einzelnen Schneckenelemente gemeinsam von einem Motor (4) bewegt.

Das Fermentationsmodul (5) besitzt Düsenöffnungen (6) auf der Hohlwelle der Schnecke über die das Fermentationsgut belüftet werden kann. Weitere Belüftungsdüsen (7) befinden sich in der unteren 10 Hälfte der Röhrenwandung verteilt. In der oberen Hälfte der Röhrenwandung sind Sprühdüsen (8) für die Zugabe flüssiger Medien angeordnet. Das sogenannte Induktionsmodul (9), welches im erfindungsgemäßen Verfahren zur Zugabe der erfindungsgemäßen Stoffe genutzt werden kann, besitzt eine Öffnung (10) mit Verschluss (11) für die Zugabe fester Stoffe auf der Oberseite der Röhrenwandung. Das Antriebsmodul (12) besitzt keine Düsen. Hier ist ferner eine der beiden 15 Stirnseiten (13) der Röhre verschlossen. Dort sind der Antriebsmotor und das Lager (14) für Welle befestigt. Auf der Oberseite der Röhrenwandung ist ein Trichter (15) mit Verschluss (16) für die Zugabe fester Stoffe und gegebenenfalls für Inokulat vorgesehen. Das Erntemodul (17) besitzt ebenfalls keine Düsen. Stattdessen ist dort auf der Unterseite der Röhrenwandung eine Öffnung (18) 20 mit Verschluß (19) zur Entnahme des Fermentationsguts befestigt. Eine der beiden Stirnseiten (20) der Röhre ist verschlossen. Dort ist das Gegenlager (21) für die Hohlwelle befestigt. Das Lager besitzt einen Anschluss zur Belüftung (22).

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 28 552.0

Anmeldetag:

24. Juni 2003

Anmelder/Inhaber:

HöFer Bioreact GmbH, 53115 Bonn/DE

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung definierter Enzym- und Metabolitgemische durch Induktion und gerichtete selektive Festphasen-Kultivierung stabiler, mikrobieller Mischpopulationen

IPC:

C 12 P 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Remus



Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung definierter Enzym- und Metabolitgemische durch Induktion und gerichtete selektive Festphasen-Kultivierung stabiler, mikrobieller Mischpopulationen

5

Beschreibung der Erfindung

10 Es ist eine Vielzahl technologischer Prozesse bekannt, bei denen Enzyme bisher nur suboptimal oder gar nicht eingesetzt werden, obgleich dies von großem ökonomischem wie ökologischem Nutzen wäre. Dazu gehören zum Beispiel Verfahren, bei denen komplexe, biologische, feste Substrate verändert oder umgesetzt werden, deren Zusammensetzung sehr heterogen ist, die v. a. auch schwer abbaubare Substanzen wie Lignocellulose enthalten und/oder die äußere Grenzschichten (z. B. verholzte Zellwände, Kuticula etc.) besitzen, welche Barrieren für Enzyme darstellen und so die Bioverfügbarkeit einschränken. Für eine effektive Behandlung dieser Substrate wären speziell auf diese Substrate hin optimierte Enzymmischungen notwendig. Dies ist bisher noch nicht als gezielte und gerichtete Herstellung durch entsprechende Fermentationen möglich.

20 Dieser Nachteil wird nun dadurch behoben, dass ein neues Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziell, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor, zur Verfügung gestellt wird, dadurch gekennzeichnet, dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein (wobei unter Zielsubstrat(en) solche verstanden sind, die in einem nachfolgenden Prozess eingesetzt werden) zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen 25 Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welche in dem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.

30 Ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist ferner, dass durch die kontinuierliche Verfahrensführung und modulare Bauweise des neuartigen Bioreaktors die zeitliche Abhängigkeit der

Produktion der Enzymgemische zu deren Optimierung im Hinblick auf den Abbau des Zielsubstrates, bzw. der Zielsubstrate simultan oder sequentiell hin genutzt wird.

5 Stand der Technik

In den letzten Jahrzehnten sind verstkt Anstrengungen unternommen worden, Biomasse durch enzymatischen Aufschluss zu behandeln (siehe zum Beispiel DE19845207A1). So existiert heute eine Reihe von Ansten, bei denen gereinigte Enzyme oder Enzymmischungen oder aber enzymproduzierende mikrobielle Rein- oder Mischkulturen zur Behandlung biologischer Substrate eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind die Behandlung von Holzhackschnitzeln im Zuge des Biopulping, die Behandlung von Einjahrespflanzen zur Verbesserung der Eigenschaften als Futtermittel oder von Bagasse zur Herstellung von Bioalkohol. Jedoch verlaufen alle diese Prozesse nach wie vor suboptimal. Der Hauptgrund dafür ist, dass die verwendeten Enzymmischungen, Mikroorganismenkulturen oder Mikroorganismen-Mischkulturen nicht in optimaler Weise an die Zielsubstrate angepasst sind (z. B. sind die Organismen und Enzyme nicht optimal an kalte bis sehr kalte Standorte adaptiert und selektiert), was z. B. beim Biopulping zu sehr langen Behandlungszeiten der Hackschnitzel führt mit entsprechend einhergehendem großen Platzbedarf für die Mietenflchen.

Viele biotechnologische Prozesse zur Behandlung von komplexen Substraten (meist Pflanzenmaterial aber auch z.B. Tierabfle aus Tierschlachterien etc.) benötigen neben den genannten Enzymgemischen (Hydrolasen, Oxidoreduktasen) zum möglichst weitgehenden Abbau oftmals zusätzlich (v. a. Oxidoreduktasen) bestimmte Cofaktoren oder Mediatoren, die teilweise noch unbekannt sind. Das heißt, dass einzelne Enzyme oder auch Zugaben von Gemischen zum Prozess nur bedingt Erfolg zeigen, da nur ein Zusammenspiel von vorher auf die Zielsubstrate hin adaptierten und optimierten Enzymgemischen zusammen mit diesen zusätzlichen Faktoren eine optimale Performance zeigen können. Dies ist aber bisher ebenfalls nicht in optimaler Weise möglich.

Aus DE3539875A1 ist z. B. ein Verfahren und eine Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung einer Enzymmischung für die Behandlung von Biomasse in Biogasanlagen bekannt. Bei diesem Verfahren wird jedoch mit einer reinen Kultur von *Aspergillus niger* und ohne Induktion dieser Kultur an die für die spätere Methanisierung verwendeten pflanzlichen Substrate gearbeitet. Deshalb ist nicht zu erwarten, dass die dort gebildete Enzymmischung optimal an den Biomasse verwertenden Prozess angepasst ist.

Optimal an ein komplexes, biologisches Substrat adaptierte und definierte Enzymgemische und/oder Metabolitgemische sind nur erzeugbar durch Selektionsdruck auf die produzierenden Mikroorganismen-Populationen (Mischkulturen) und durch deren Induktion durch die entsprechenden Zielsubstrate.

5

Nun ist allgemein bekannt, dass die Anwendung eines Selektionsdrucks auf Mischpopulationen von Mikroorganismen durch Einstellen definierter Umweltparameter im Zuge der Kultivierung dieser Organismen in der Regel zu bestimmten Populationsspektrien führt. Diese Populationsspektrien sind jedoch ungerichtet und zufällig.

10 Ebenso ist bekannt, dass durch die Wahl der Kulturbedingungen bestimmte Arten von Mikroorganismen angereichert oder Kontaminanten unterdrückt werden können.

Bekannt ist auch, dass es während des Verlaufs solcher Kulturen in Abhängigkeit von den gewählten Selektionsbedingungen, aber auch in Abhängigkeit von der Substratbeschaffenheit und der Induktionsverfügbarkeit (bei nicht konstitutiv gebildeten Proteinen und Metaboliten) zu zeitlich variierenden

15 Metabolitspektrien kommen kann. Jedoch gilt auch hier, dass diese Metabolitspektrien ungerichtet und zufällig sind.

Verfahren der genannten Art werden z.B. auf definierten festen Nährböden (Agarplatten → Mutagenesebehandlungen, genetische Transformationen etc.) sowie im Bereich der Submerskultertechnik eingesetzt (in Form von Chemostaten oder Turbidostaten auch kontinuierlich). In letzterem 20 Falle handelt es sich vor allem um Kultivierungen von Reinkulturen zur Erzielung von spezifischen Stoffwechselleistungen.

Bioreaktoren zur kontinuierlichen Umsetzung fester Substrate sind aus verschiedenen Anwendungsbereichen (Lebensmitteltechnik, Kompostiertechnik usw.) bekannt. Beispielsweise wird das Fermentationsgut in Kompostieranlagen über Walzen befördert. Solche Verfahren erlauben aber keine anspruchsvolle Regulation der Kultivierungsparameter. Die Verwendung von einer oder mehreren Förderschnecken in Festphasen-Bioreaktoren ist zum Beispiel aus DE10041977A1, DE4308920A1 und DE 4208920A1 bekannt. Diese Bioreaktoren sind jedoch nicht modular ausgelegt und sehen ebenfalls keine Möglichkeit der späteren Zugabe von Substraten und 30 anderen Stoffen zur z. B. Induktion vor.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Diese beschriebenen Nachteile des Stands der Technik werden durch das im folgenden beschriebene erfindungsgemäße Verfahren sowie den erfindungsgemäßen Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung dieses Verfahrens behoben.

Es wird ein neues Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor, zur Verfügung gestellt. Dieses ist dadurch gekennzeichnet, dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein allein (wobei unter Zielsubstrat(en) solche verstanden sind, die in einem nachfolgenden Prozess eingesetzt werden) zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt (Wasseraktivität), pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welche in einem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.

Dabei sind spezielle Hemmstoffe solche, wie sie z.B. in: R. Vogel; Natürliche Enzyminhibitoren, Georg Thieme Verlag, 1984 und in: H. Zollner; Handbook of Enzyme Inhibitors, VCH, 1989 beschrieben sind.

Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist, dass die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische entweder als solche eingesetzt werden, oder eine Abtrennung des Substrat-Pilz-Gemisches zur Gewinnung des flüssigen Enzymcocktail erfolgt. Des Weiteren ist es möglich, die in solcher Weise gewonnenen flüssigen Enzymmischungen einem weiteren Downstream-Prozessen zu unterziehen (Aufreinigung durch Ultrafiltrationen, Chromatographieverfahren etc.).

Ebenfalls ist ein wichtiger Bestandteil der Erfindung, dass die natürliche Kontaminationspopulation von bestimmten Zielsubstraten/Substraten ausgenutzt wird, um daraus gewünschte Keime mit gewünschten Eigenschaften zu selektieren; noch fehlende Eigenschaften können durch Zugabe geeigneter Induktoren inklusive der auf diesen vorhandenen oder selektierten Keime supplementiert werden. Diese Zugabe kann zu Beginn der Kultivierung oder während der Anzucht geschehen. Es können auch Reinkulturen, die auf diesen Zielsubstraten/Substraten natürlicherweise vorkommen, daraus gezüchtet wurden oder aus Sammlungen stammen oder

andere Organismenstämme (z.B. Hochleistungsstämme), die in ihrem Enzymspektrum passend sind, zugegeben werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist ferner, dass das erfindungsgemäße Verfahren aus einer bis mehreren Verfahrensstufen bestehen kann. Diese Verfahrensstufen können generell gleichzeitig ablaufen, d. h. es wird mit gleichzeitig eingesetzten mehreren Zielsubstraten/Substraten gearbeitet, zusätzliche Induktoren und/oder Hemmstoffe können gleichzeitig oder während der Kulturdauer zugegeben werden. Es können aber auch zeitlich hintereinander Substrate eingesetzt werden, wobei nicht alle per se Zielsubstrate sein müssen. Dies wird durch die kontinuierliche Verfahrensführung und modulare Bauweise des neuartigen Bioreaktors ermöglicht, der durch seine erfindungsgemäße Bauweise eine zusätzliche Substratzugabe, Zugabe von anderen Induktoren, Hemmstoffen, Zugabe von Mikroorganismenkulturen, Änderung des Selektionsdrucks etc. während der Kulturdauer erlaubt. Damit verbundenen ist die wichtige erfindungsgemäße Option, die zeitliche Abhängigkeit der quantitativen bzw. qualitativen Produktion der Enzymgemische bevorzugt auch als Stellgröße für die Regelung des laufenden Prozess selbst aber auch der nachgeschalteten Zielprozesse zu nutzen.

15

Bei Anzuchten mit mehreren Verfahrensstufen (z. B. 2-stufig) wird abhängig vom Zielprozess auf geeigneten Substrate durch Ausnutzung des natürlichen Bewuchses dieser Substrate und gegebenenfalls durch eine zusätzliche, unterstützende Inokulation mit Reinkulturen (auch Hochleistungsstämme und auch aus Sammlungen) sowie durch Einstellen selektiver Bedingungen durch Wahl der Wasseraktivität, des pH-Werts, des Redoxpotentials, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der Verfügbarkeit von Induktoren usw. in einer ersten Phase eine entsprechende Mischkultur erzeugt. Ziel dieser ersten Phase des Verfahrens ist es, einen für die zweite Phase geeigneten Pool an mikrobiellen Populationen zur Verfügung zu stellen. Die Mischkultur wird in der zweiten Stufe des Verfahrens durch Zugabe eines weiteren Substrates, welches auch in der Regel das Zielsubstrat ist, und durch Einstellen gegebenenfalls anderer (als in der ersten Stufe) selektiver Bedingungen durch eine geeignete Wahl der Wasseraktivität, des pH-Werts, des Redoxpotentials, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der Verfügbarkeit von Induktoren usw. gerichtet in eine stabile und adaptierte Mischkultur überführt (fine-tuning), die nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes Spektrum an Enzymen und/oder Metaboliten erzeugt, das an die zur Induktion verwendeten Zielsubstrate optimal adaptiert ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich auf alle technologischen Prozesse anwendbar, bei denen biologische Substrate verändert oder umgesetzt werden und eine Behandlung dieser Substrate durch Enzyme entweder Gegenstand der Prozesse selbst ist, oder aber als Vor- oder Zusatzbehandlung genutzt werden kann. Inbesondere kann das erfindungsgemäße Verfahren für Prozesse aus der holzverarbeitenden Industrie, der Papier- und Zellstoffindustrie, der Textilindustrie, der Lederindustrie, der tierverarbeitenden Industrie, der Waschmittelindustrie, der Futterindustrie, der

Lebensmittelindustrie, in der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung und in der Reststoffverarbeitung und Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

Gleichfalls ist der erfindungsgemäße Bioreaktor gegenüber dem geschilderten Stand der Technik für sich genommen neu und erfinderisch. Zugleich ist der Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung des dargestellten erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignet.

Andere Reaktortypen zur Festphasen-Kultivierung von Mikroorganismen wie beispielsweise 'Bioreactor for fermenting solids' (PCT WO 01/19954), 'Bioreactor having at least two reaction chambers' (WO 02/100999 A2), 'Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen und Bioreaktor' (PCT/EP03/01663) sowie weitere bekannte Feststoffbioreaktoren (Bautypen sind etwa Schneckenreaktoren, Trommelreaktoren, Turmreaktoren, Rieselfilmreaktoren usw.) sind, gegebenenfalls modifiziert oder in Form einer Kaskade, grundsätzlich ebenfalls geeignet.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist, dass der erfindungsgemäße, kontinuierliche Bioreaktor, gegebenenfalls als Kaskade eingesetzt wird, um die zeitliche Abhängigkeit der Produktion der Enzymgemische zu deren Optimierung im Hinblick auf den Abbau des Zielsubstrats bzw. der Zielsubstrate simultan und sequentiell hin zu nutzen, d. h. es wird möglich, einen oder mehrere dem Enzymsbildungsprozess nachgeschaltete Prozesse simultan oder sequentiell mit entsprechend optimierten Enzymcocktails simultan oder sequentiell zu versorgen.

Der erfindungsgemäße Bioreaktor (nach Abb. 1) besteht aus einer beliebigen Anzahl von Modulen, wobei insgesamt 4 Typen von Modulen vorgesehen sind. Alle Module bestehen aus einer Edelstahlröhre o. Kunststoffröhre (1), in der eine Schnecke mit Hohlwelle (2) drehbar gelagert ist. Die Schnecke ist mit Schikanen (3) zur vertikalen Vermischung des Fermentationsguts ausgestattet. Die einzelnen Module und auch die Förderschnecke können über ein geeignetes Verbindungssystem aneinander befestigt werden. Im zusammengesetzten Zustand werden die einzelnen Schneckeelemente gemeinsam von einem Motor (4) bewegt.

Das Fermentationsmodul (5) besitzt Düsenöffnungen (6) auf der Hohlwelle der Schnecke über die das Fermentationsgut belüftet werden kann. Weitere Belüftungsdüsen (7) befinden sich in der unteren Hälfte der Röhrenwandung verteilt. In der oberen Hälfte der Röhrenwandung sind Sprühdüsen (8) für die Zugabe flüssiger Medien angeordnet. Das sogenannte Induktionsmodul (9), welches im erfindungsgemäßen Verfahren zur Zugabe der erfindungsgemäßen Stoffe genutzt werden kann, besitzt eine Öffnung (10) mit Verschluss (11) für die Zugabe fester Stoffe auf der Oberseite der Röhrenwandung. Das Antriebsmodul (12) besitzt keine Düsen. Hier ist ferner eine der beiden Stirnseiten (13) der Röhre verschlossen. Dort sind der Antriebsmotor und das Lager (14) für die Welle befestigt. Auf der Oberseite der Röhrenwandung ist ein Trichter (15) mit Verschluss (16) für die

Zugabe fester Stoffe und gegebenenfalls für Inokulat vorgesehen. Das Erntemodul (17) besitzt ebenfalls keine Düsen. Stattdessen ist dort auf der Unterseite der Röhrenwandung eine Öffnung (18) mit Verschluß (19) zur Entnahme des Fermentationsguts befestigt. Eine der beiden Stirnseiten (20) der Röhre ist verschlossen. Dort ist das Gegenlager (21) für die Hohlwelle befestigt. Das Lager besitzt einen 5 Anschluss zur Belüftung (22).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor wie folgt kontinuierlich durchgeführt:

Entweder das Zielsubstrat selbst oder in Mischungen mit anderen Substraten oder mehrere 10 Zielsubstrate als Gemisch oder entsprechend dem Zielsubstrat ausgewählten Substrate werden über den Trichter (15) in das Antriebsmodul (12) kontinuierlich eingebracht. Gegebenenfalls wird mit den Substraten auch ein definiertes Inokulum bestehend aus einer oder mehreren mikrobiellen Reinkulturen zugegeben. Das Fermentationsgut wird vor Beginn des Prozesses hinsichtlich der Wasseraktivität, des pH-Werts und des Redoxpotentials eingestellt. Die 15 Fermentationsmasse wird über eine geeignete Anzahl an Fermentationsmodulen mit Hilfe der Schneckeelemente (2) in Richtung Erntemodul (17) transportiert. In den Fermentationsmodulen (5) werden über geeignete Sensoren die Wasseraktivität, Temperatur, gegebenenfalls der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration kontinuierlich gemessen. Die Einstellung dieser Parameter erfolgt durch Steuerung der Belüftungsrate und des Feuchtegehalts der über die Belüftungsdüsen 20 (6,7) eingeblasenen Luft sowie durch die Zugabe von Wasser oder Pufferlösungen über die Sprühdüsen (8). Über das entsprechend positionierte Induktionsmodul (9) können kontinuierlich weitere Substrate (bzw. Zielsubstrate) zur weiteren induktiven Optimierung der entstandenen Mischkultur in den Reaktor eingebracht werden. In den dem Induktionsmodul nachgeschalteten 25 Fermentationsmodulen werden gegebenenfalls andere Kulturbedingungen so eingestellt, dass gerichtet eine stabile und definierte mikrobielle Mischkultur entsteht, die nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes Enzym- und/oder Metabolitspektrum so erzeugt, dass dieses am Erntemodul (17) zur Entnahme vorliegt. Die Kulturdauer wird über die Drehgeschwindigkeit der Förderschnecke und die Anzahl an Fermentationsmodulen eingestellt. Ebenfalls kann der Bioreaktor durch eine geeignete Anzahl und Zusammenstellung der Module an die 30 Zielerfordernisse angepasst werden. Die Förderleistung richtet sich nach der Befüllungshöhe des Reaktors. Das am Erntemodul (17) entnommene Fermentationsgut kann entweder direkt oder nach einer entsprechenden Aufbereitung kontinuierlich dem Zielprozess zugeführt werden.

Im Falle einer Anordnung mehrerer erfindungsgemäßer Bioreaktoren in Form einer Kaskade ist 35 der Übergang von einem in den nächsten Reaktor wie folgt vorgesehen: Das Erntemodul des vorgeschalteten Teilreaktors wird mit dem Beschickungsmodul des nachgeschalteten Teilreaktors

derart verbunden, dass das Erntemodul bodenständig mit einer beweglichen Schikane zur Strömungsteilung der Fermentationsmasse ausgestattet wird und das Erntemodul des vorgeschalteten Teilreaktors zwei verschließbare Ausläufe besitzt. Einer der beiden Auslässe wird mit dem Zulauf des nachgeschalteten Teilreaktors verbunden und dient der Weiterführung eines Teils des Substratstroms innerhalb des Prozesses. Der zweite Auslauf dient der Entnahme des anderen Teils des Substratstroms zur weiteren Verwendung. Dabei wird die Schikane so positioniert, dass der Substratstrom geeignet portioniert wird. Besonders bevorzugt wird werden die Förderschnecken der Teilreaktoren durch einen gemeinsamen Antrieb bewegt.

10

Anwendungsbeispiel:

Kontinuierliche Produktion spezifischer Hydrolase-Coctails zur Optimierung der Biogassynthese aus nachwachsenden Rohstoffen

15 Die vorliegende Erfindung, bestehend aus dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie dem erfindungsgemäßen Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung des Verfahrens wird durch das folgende Anwendungsbeispiel näher beschrieben.

Nachwachsende Rohstoffe enthalten große Mengen schwer abbaubarer Biopolymere wie 20 Lignocellulose, Cellulose, Hemicellulosen (Xylan), Pektin, Cutin etc.. Diese mengenmäßig bedeutsamen Biopolymere, die den Hauptbestandteil oder wichtigen Anteil von Rapsabfällen, Stroh oder Heu bilden und in der Landwirtschaft in großen Mengen anfallen, können bislang in Biogasanlagen nicht oder nur suboptimal genutzt werden. Zudem ist ihr Einsatz als Futtermittel 25 zum Teil durch gesetzliche Verordnungen begrenzt. Die Verwertung beispielsweise von Raps-Reststoffen in Biogasanlagen würde es ermöglichen, auf stillgelegten Flächen in größerem Maßstab Raps zur Biodieselgewinnung anzubauen, ohne bestehende Abkommen zwischen der EU und den USA zu tangieren.

Die Umwandlung von beispielsweise Rapsschrot in Biogas gelang bislang nur mäßig, da anaerob lebende Bakterien nur bedingt in der Lage sind, deren Bestandteile als Kohlenstoffquelle effizient 30 nutzen zu können. Ebenfalls besitzen andere nachwachsende Rohstoffe wie Stroh etc. noch schlechter verfügbare Kohlenstoffquellen (Faserstruktur) für die Biogasproduktion.

Dieser Nachteil soll nun künftig dadurch behoben werden, dass dem Prozess der Biogassynthese aus Raps-Reststoffen das erfindungsgemäße Verfahren - durchgeführt in dem erfindungsgemäßen 35 Bioreaktor - vorgeschaltet wird. Dies ermöglicht es den Betreibern einer Biogasanlage, nach

Bedarf an die zur Biogasproduktion verwendeten Substrate optimal angepasste Enzymmischungen selbst preisgünstig herzustellen.

Verfahrensgemäß wird bei einer 2-Phasenanzucht bevorzugt in der ersten Verfahrensstufe auf Pressrübenschitzeln (diese stellen selbst Reststoffe aus der Verarbeitung eines landwirtschaftlichen Produkts dar und stehen ganzjährig zur Verfügung) unter geeigneten Kulturparametern selektiv eine Mischkultur bevorzugt bestehend aus solchen filamentösen Pilzen erzeugt, die hydrolytische Enzyme produzieren. In einer zweiten Verfahrensstufe wird durch Zugabe des Zielsubstrats, hier von Rapsschrot (das im nachgeschalteten Prozess gemeinsam mit beispielsweise Rindergülle methanisiert wird), selektiv und gezielt eine konditionierte Mischkultur erzeugt, die ein dem Zielsubstrat Rapsschrot angepaßtes Spektrum hydrolytischer Enzyme (Cellulasen, Xylanasen, Chitininasen, Pektininasen, Proteasen, Lipasen, Esterasen) nach einer gegebenen Kulturdauer produziert. Das gesamte, enzymhaltige Fermentationsgut wird dem Biogasprozess kontinuierlich zugegeben. Die aktiven Enzyme schließen innerhalb der Methanisierungsstufe die pflanzlichen Polymere des Rapsschrots auf. Durch eine geeignete Dosage der Enzymmischung kann außerdem der Spiegel freier Zucker in der Methanisierungsstufe auf ein optimales Niveau eingestellt und gehalten werden. So kann die Produktion von Biogas auf der Basis von Rapsschrot erhöht und die Umsatzzeiten deutlich verkürzt werden.

Durch das neue Verfahren können außerdem viele andere, bislang ungenutzte Substrate wie Heu und Stroh einer Verwertung in Biogasanlagen zugeführt werden.

Die vorliegende Erfindung, bestehend aus dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie dem erfindungsgemäßen Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung des Verfahrens ist nicht auf die beschriebene Anwendung beschränkt.

Die beschriebene Anwendung ist in folgendem Beispiel näher erläutert:

Beispiel 1 (Zweiphasenkultur zur Erzeugung von Hydrolasegemischen für einen nachfolgenden Biogasprozess)

30 20 g nicht-autoklavierte Pressrübenschitzel werden mit Pufferlösung auf einen Gesamtfeuchtegehalt von 50% und pH 6.0 gebracht und bei 30°C 11 Tage inkubiert (1. Phase). In diesem Ansatz entwickelt sich eine Mischkultur aus *Penicillium chrysogenum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus tubingensis*. Verschiedene Glucanasen, Xylanasen, Proteasen, Pectininasen, Esterasen und Lipasen werden von dieser Mischkultur sekretiert. Diese Mischkultur wird mit 10 g Rapsschrot, dass ebenfalls mit Pufferlösung auf 40% Feuchte und pH 5.5 gebracht wird, induziert (2. Phase). Als

Kontrolle werden 10 g Pressrübenschitzel unter sonst gleichen Bedingungen zugegeben. Nach 6 Tagen Inkubation bei 30°C zeigt sich eine Dominanz von Eurotium amstelodami und eine Zunahme der Xylanaseaktivität um den Faktor drei bei gleichbleibender Cellulaseaktivität im Vergleich zur Mischkultur (Phase 1) und zur Kontrolle. Die hydrolytische Gesamtaktivität, gemessen als 5 Fluoresceindiacetat-Hydrolyse, steigt unter den gleichen Bedingungen um den Faktor 10. Mit diesem Enzymcocktail konnte im Laborversuch die Methanproduktion auf der Basis von Rapsschrot und Rindergülle (im Verhältnis 1:1, Gesamtfeuchtegehalt 65%) um 12% gegenüber der Kontrolle (Enzymcocktail durch Erhitzen inaktiviert) gesteigert werden. Mit dem Enzymcocktail des durch Zugabe 10 von Pressrübenschitzeln anstelle von Rapsschrot erhaltenen Ansatzes ergab sich immerhin noch eine Steigerung der Biogasausbeute um 4%.

Patentansprüche

- 1) Neuartiges Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor, entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, dadurch gekennzeichnet dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt (Wasseraktivität), pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welche in einem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.
- 2) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Substrate oder Zielsubstrate alle möglichen Rohstoffe oder Abfälle natürlichen (mikrobiellen, pflanzlichen, tierischen oder menschlichen) und nicht natürlichen, industriellen Ursprungs und deren Gemische eingesetzt werden.
- 3) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Mikroorganismen in Mischkultur eingesetzt werden.
- 4) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Ascomyceten, Deuteromyceten) der Gattungen *Penicillium spec.*, *Aspergillus spec.*, *Trichoderma spec.*, *Fusarium spec.*, *Eurotium spec.*, *Absidia spec.*, *Neurospora spec.*, *Mucor sp.*, *Chaetomium sp.*, *Rhizopus sp.*, etc. eingesetzt werden
- 5) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Ascomyceten, Deuteromyceten) der Arten *Penicillium chrysogenum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum* eingesetzt werden.

6) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Weißfäulepilze, Braunfäulepilze) der Gattungen *Trametes spec.*,
5 *Pleurotus spec.*, *Phanerochaete spec.*, *Nematoloma spec.* und *Agaricus spec.* etc. eingesetzt werden.

7) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
10 dass als Mikroorganismen Bakterien (Actinomyceten) der Gattungen *Streptomyces spec.* etc. eingesetzt werden.

8) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
15 dass die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische entweder als solche eingesetzt werden, oder eine Abtrennung des Substrat-Pilz-Gemisches zur Gewinnung von flüssigen Enzymcocktails erfolgt.

9) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von
20 Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren aus einer bis mehreren Verfahrensstufen bestehen kann.

10) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
25 dass zur Produktion dieser Enzymgemische (hydrolytische Enzymcocktails) zur Supplementierung einer Biogasanlage eine 2-Phasen-Anzucht durchgeführt wird.

11) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
30 dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor nach Abb. 1. entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, erfolgen.

12) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen

Schneckenreaktor nach Abb. 1 entweder einzeln oder in einer Kaskade angeordnet in der beschriebenen Weise erfolgen.

13) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor nach Abb. 1 in der beschriebenen Weise zur kontinuierlichen Produktion spezifischer Hydrolase-Coctails zur Optimierung der in einem weiteren Prozess folgenden Biogassynthese aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgt.

10

14) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erfundungsgemäße, kontinuierliche Bioreaktor als Kaskade eingesetzt wird.

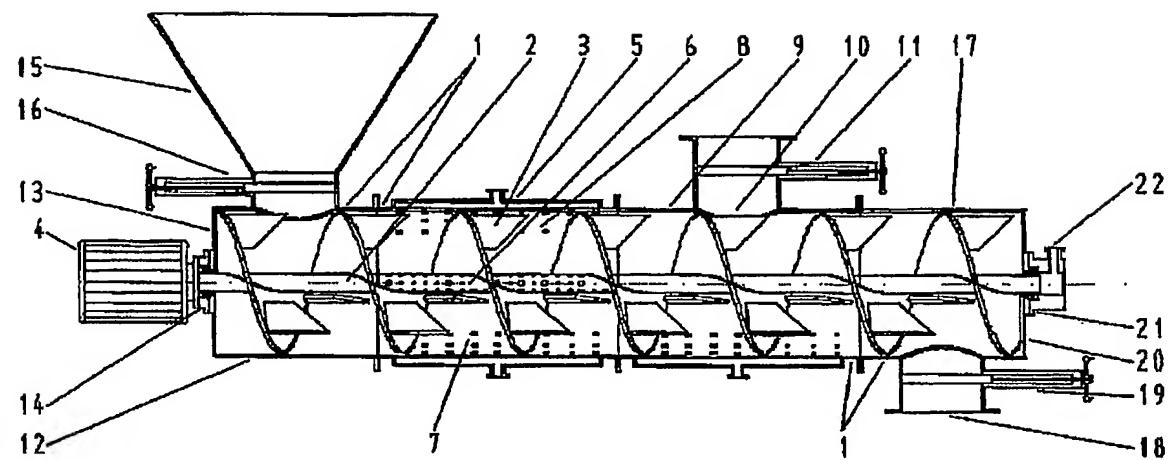
15) 15) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor nach Abb. 1 in der beschriebenen Weise zur kontinuierliche Produktion spezifischer Hydrolase-Coctails und/oder Oxidoreduktase-Coctails für Prozesse aus der holzverarbeitenden Industrie, der Papier- und Zellstoffindustrie, der Textilindustrie, der Lederindustrie, der tierverarbeitenden Industrie, der Waschmittelindustrie, der Futterindustrie, der Lebensmittelindustrie, in der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung und in der Reststoffverarbeitung und Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

25

Zusammenfassung

Neuartiges Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfundungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen 5 Schneckenreaktor, entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, dadurch gekennzeichnet dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfundungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren 10 Zielsubstraten in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder diesen allein allein zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt (Wasseraktivität), pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch 15 spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welches in einem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.

Abb. 1



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/051234

International filing date: 24 June 2004 (24.06.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 009 161.7
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.